



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C12Q 1/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36568  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00175  (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Januar 1999 (15.01.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: 198 02 174.7 19. Januar 1998 (19.01.98) DE 198 34 932.7 28. Juli 1998 (28.07.98) DE		(71)(72) Anmelder und Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9, D-10435 Berlin (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLK, Hans-Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). WALDEN, Peter [DE/DE]; Rykestrasse 4, D-10405 Berlin (DE). SCHEFFOLD, Alexander [DE/DE]; Alexandrinestrasse 4, D-10969 Berlin (DE). BLASZCZYK, Rainer [DE/DE]; Ginsterweg 11, D-30989 Burgwedel (DE).		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING T-CELL STIMULATING PROTEIN FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM IDENTIFIZIEREN VON T-ZELL-STIMULIERENDEN PROTEINFRAGMENTEN

## (57) Abstract

The invention relates to a method for identifying T-cell stimulating protein fragments using the following steps: a) detecting the amino acid sequence of an antigen; b) subdividing the found amino acid sequence of the antigen into protein fragments; c) synthesizing at least one protein fragment; d) incubating a suspension containing t-cells with the protein fragments; e) identifying an induced T-cell cytokine or activation marker by flow-through cytometry, and; f) assigning the T-cells, with which T-cell cytokines and/or activation markers were identified, to the protein fragments which were incubated with the T-cells. The corresponding protein fragments/peptides are synthetically produced with the assistance of the detected positive sequence, and said corresponding protein fragments/peptides can be utilized to produce a medicament for immunostimulation.

## (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten mit den folgenden Schritten: a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente, c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment, d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit den Proteinfragmenten, e) Identifizieren von einem induzierten T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker, durch Durchflusszytometrie, und f) Zuordnen der T-Zellen, bei denen T-Zell-Zytokine und/oder Aktivierungsmarker identifiziert wurden, zu den Proteinfragmenten, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden. Mit Hilfe der ermittelten positiven Sequenz werden die entsprechenden Proteinfragmente/Peptide synthetisch hergestellt und lassen sich zur Herstellung eines Medikamentes zur Immunstimulation verwenden.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten

Die Erfindung umfaßt ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten mit Hilfe einer T-Zell-Induktion, ein Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten mit einer Sequenz, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurde, und eine Verwendung dieser Proteinfragmente zur Immunstimulation.

### 10 Stand der Technik

Die T-Zell-stimulierenden Proteinfragmente umfassen T-Zell-Epitope, die von T-Zell-Rezeptoren spezifisch erkannt werden und mittels dieser Erkennung unter anderem die T-Zellen zur Biosynthese von Zytokinen, die üblicher Weise sekretiert werden, 15 anregen.

Ein bekanntes Verfahren zur Identifizierung von T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten besteht darin, daß ein Protein, dessen Aminosäure-Sequenz bekannt ist, in einzelne überlappende Proteinfragmente aufgeteilt wird. Die 20 entsprechenden synthetisch hergestellten Proteinfragmente werden einzeln oder in Gruppen mit T-Zellen inkubiert. Nach ein bis drei Wochen liegen gegebenenfalls Zell-Linien oder Zell-Klone vor, die spezifisch durch das bzw. mindestens eines der eingesetzten Proteinfragment stimuliert werden konnten. Die Spezifität dieser Linien oder Klone kann durch Zytotoxizitätstestung an entsprechenden Zielzellen (engl.: 25 target cells) nachgewiesen werden. Aufgrund der Versuchsanordnung können die stimulierten Zell-Linien oder Zell-Klone den entsprechenden T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten zugeordnet werden. Diese Methode ist ausführlich in P. WALDEN et al. (1996) Current Opinion in Immunology, Vol. 8, pp 68-74 beschrieben. Alternativ kann die Proliferation von Zellen nach 1 Woche durch Inkorporation von 3H-Thymidin 30 bestimmt werden, was aber mit größerer Unspezifität behaftet ist.

Nachteil dieser beiden Methoden ist der hohe apparative, personelle und zeitliche Aufwand. Außerdem ist es wahrscheinlich, daß stimulierte T-Zellen während der langen Inkubationszeit absterben, z.B. durch den aktivierungsinduzierten, programmierten Zelltod (Apoptose) und falsch negative Ergebnisse daraus resultieren.

Ein Verfahren zur durchflußzytometrischen Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen nach S. L. WALDROP et al., (1997) *Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency.* J Clin. Invest. Vol 99, pp 1739-1750 besteht darin, daß Proteine als Antigen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) inkubiert werden. Dabei werden diese Proteine von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und präsentiert. Diese Prozessierung führt zu Proteinfragmenten, mit welchen MHC-Klasse-II-Moleküle beladen werden und dann zur Zelloberfläche gelangen (Antigenpräsentation). Die durch die Erkennung von Proteinfragmenten jeweils stimulierten T-Zellen werden durchflußzytometrisch identifiziert. Dabei ist es weder möglich die stimulierenden Proteinfragmente zu ermitteln, noch die spezifisch induzierten T-Zellen den induzierenden Proteinfragmenten zuzuordnen. Aufgabe dieser Versuchsanordnung ist es vor allem, festzustellen, ob MHC-Klasse-II präsentierte Epitope in einem Protein oder komplexen Antigen vorhanden sind bzw. ob ein Individuum gegen solche möglicherweise oder bekanntermaßen vorhandenen Epitope spezifische MHC-Klasse-II restringierte T-Zellen besitzt und wie hoch die Frequenz dieser Zellen ist (Quantifizierung der antigenspezifischen T-Zellen). Zusätzlich lassen sich weitere Eigenschaften der stimulierten T-Zellen ermitteln (Oberflächenmarker etc.). Aber, weder die Aminosäure-Sequenz vorhandener Epitope noch die Häufigkeit solcher Epitope läßt sich ermitteln.

#### Aufgabe und Lösung

25

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren anzubieten, mit dem Proteinfragmente, deren Aminosäure-Sequenzen bekannt sind, in kurzer Zeit als stimulierende Proteinfragmente identifiziert werden können. Dabei soll die Methode auch bei kleiner Anzahl an T-Zellen arbeiten, ohne daß T-Zell-Linien oder -Klone zur Verfügung stehen müssen. Weiterhin soll es möglich sein, aus einer großen Anzahl an Proteinfragmenten, diejenigen herauszufinden, welche T-Zellen stimulieren.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:

- a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,  
welches ein Protein oder Peptid ist,
- 5 b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,
- c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,  
10 dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,
- d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,
- 15 e) Identifizieren
  - (i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin,  
das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,  
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden vor,  
20 und / oder
  - (ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,  
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein  
dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und
- 25 f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

**Vorteile:**

Der Vorteil dieses erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß innerhalb von sehr kurzer Zeit und im Vergleich zur konventionellen Methode mit sehr geringem Aufwand ein bezüglich der Sequenz bekanntes Proteinfragment als ein T-Zell 5 stimulierendes Proteinfragment identifiziert werden kann. Die Zeit zwischen erster Inkubation von T-Zellen und durchflußzytometrischer Auswertung kann sechs Stunden betragen. Dabei können kleinste Zell-Zahlen ausreichen. Wenn mit einer Anzahl von 1 • 10<sup>6</sup> peripheren weißen Blutzellen gestartet wird, kann zweifelsfrei eine positive Antwort noch festgestellt werden, wenn 0,1% der Ausgangs-T-Zellzahl stimulierte T- 10 Zellen sind. Dagegen benötigt die klassische Methode eine Zellzahl von etwa 8 • 10<sup>6</sup> peripheren weißen Blutzellen je Proteinfragment oder Mischung aus Proteinfragmenten, um anschließend einen Zytotoxizitätstest erfolgreich durchführen zu können. Das erfindungsgemäße Verfahren ist also ein Verfahren, welches mit hoher Effizienz zum T-Zell-Epitopmapping von Proteinantigenen eingesetzt werden 15 kann.

Weiterhin können Gemische aus frisch isolierten zellulären Blutzellen oder Gewebezellen verwendet werden. T-Zell-Linien oder T-Zell-Klone sind nicht für dieses erfindungsgemäße Verfahren notwendig. Hierdurch ergeben sich Zeitvorteile bei der Inkubation und weiterhin sehr wesentlich, ein Vorteil bezüglich der Viabilität der T- 20 Zellen, welche in der kurzen Inkubationszeit als großer Pool mit hoher Variabilität vorliegen. Eine Selektion und Proliferation, die mit einer gezielte Eliminierung bestimmter T-Zellen einhergeht, erfolgt aufgrund der kurzen Inkubationszeiten bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht.

Bevorzugt als Quelle der zu stimulierenden T-Zellen sind solche Spender, welche 25 zuvor eine immunologische Primärantwort gegen das Antigen aufgebaut haben. Dies kann beispielsweise im Rahmen einer Infektion stattgefunden haben oder auch im Rahmen einer Immunisierung. Auch bei einer Autoimmunantwort ist diese Situation gegeben.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der MHC-Typ des Spenders nicht bekannt sein 30 muß. So werden zum Beispiel Proteinfragmente mit 9 Aminosäuren aus einem Protein mit den T-Zellen inkubiert, ohne daß man den MHC-Typ des Blut- oder Zellspenders kennt. Dennoch lassen sich die T-Zell stimulierenden Proteinfragmente identifizieren. Somit ist zum Identifizieren des Epitops die Kenntnis des MHC-Typs nicht erforderlich. Beim klassischen Test mittels zytotoxischen T-Zell-Linien oder Klonen müssen die 35 Zielzell-Linien (Target-Zell-Linien) im MHC mit den Effektor-Zellen übereinstimmen.

Das Erstellen von Target-Zell-Linien aus Spenderblut bedeutet einen zusätzlichen materiellen und zeitlichen Aufwand.

Weiterhin kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine große Anzahl an Proteinfragmenten zur selben Zeit inkubiert werden. Geringe Zell-Zahlen und hochsensitive

5 Detektion stimulierter T-Zellen erlauben eine zeitlich deutlich vorteilhafte Identifizierung der T-Zell stimulierenden Proteinfragmente.

Da die Anzahl der zu untersuchenden Proteinfragmente aufgrund des geringen notwendigen Arbeitsaufwandes sehr hoch sein kann, ist es nicht notwendig mögliche Epitope mittels theoretischer Vorhersagen einzuschränken. Die Epitope werden rein

10 empirisch gefunden, und es können deshalb auch solche T-Zell-Epitope gefunden werden, die sich aufgrund einer theoretischen Voraussage nicht ergeben würden.

Mit diesem Verfahren lassen sich leicht T-Zellen identifizieren, die spezifisch durch bestimmte ausgewählte Proteinfragmente stimulierbar sind.

T-Zell-stimulierende Proteinfragmente binden einerseits an definierte MHC-Moleküle

15 und andererseits enthalten sie Aminosäuresequenzen (Epitope), welche mit der Antigenbindungsregion des T-Zell-Rezeptors (Paratop) eine Bindung eingehen können.

Die Begriffe Protein oder Peptid haben als wesentliches Merkmal die Sequenz von mindestens neun Aminosäuren. Dabei ist gleichgültig, wie die Sequenz ermittelt

20 worden ist. So kann bei einem neuen Protein die Sequenz zum erstenmal analysiert werden oder bei bekannten Protein aus einer Datenbank abgelesen werden. Wichtig ist nur, daß die Aminosäuresequenz des Proteinfragments bestimmt ist. Auch die Unterteilung der Protein- oder Peptidsequenz kann unterschiedlich ausfallen. So können die Proteinfragmente schrittweise mit der Variation von einer Aminosäure aus

25 einem Protein abgeleitet werden. Andere Überlappungen sind ebenfalls denkbar. Es handelt sich dabei um das klassische Verfahren eines Protein-Mappings.

T-Zellen enthaltende Suspensionen im Sinne dieser Anmeldung zeichnen sich dadurch aus, daß sie Zellen enthalten, welche MHC-gebundene Peptide präsentieren können. So können die präsentierenden Zellen neben den Antigen-präsentierenden

30 Zellen auch zum Beispiel T-Zellen sein.

#### Weitere Ausführungsformen

Vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, da das Identifizieren von mindestens einem

T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmerker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt. Schon kleinste Mengen an T-Zellen, welche Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden enthalten, reichen aus.

- 5 Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltenden Suspensionen Zellen enthalten, die das Proteinfragment im wesentlichen mit MHC-Klasse-I oder-II (Haupt Histokompatibilitäts Komplex, MHC = Major Histocompatibility Complex) präsentieren. Neben den zur Verankerung in der Spalte des MHC-Moleküls dienenden Aminosäuren (Bindungsanker) müssen bestimmte Sequenzen vorhanden sein, die von einem T-Zell-Rezeptor spezifisch erkannt werden (T-Zell-Epitope), damit das Proteinfragment als T-Zell-Epitop funktioniert.
- 10 Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt. Es ist bekannt, daß an Moleküle der MHC-Klasse I (MHC = Major Histocompatibility Complex) bindende Proteinfragmente in der Regel eine Länge von 9 Aminosäuren aufweisen, während Proteinfragmente, welche an MHC-Klasse II Moleküle binden, etwas länger und in der Länge stärker variabel sind.
- 15 Vorteilhaft ist, daß die Proteinfragmente trotz der kurzen Inkubationszeit von den MHC-Molekülen, die sich auf der Zelloberfläche befinden, ausreichend aufgenommen werden, um eine eindeutige Identifizierung stimulierter T-Zellen nach zum Beispiel sechs Stunden zu ermöglichen. Werden weiterhin kurze Proteinfragmente (Klasse I mit 9 Aminosäuren und Klasse II mit vorzugsweise 11-15 Aminosäuren) verwendet, läßt sich das in einer stimulierenden Aminosäuresequenz vorhandene Epitop maximal eingrenzen.
- 20 Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltende Suspension eine Suspension ist aus Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen. Das Verfahren wird erheblich dadurch vereinfacht, daß die T-Zellen enthaltenden Suspensionen aus unterschiedlichster Quelle stammen können. Weiterhin ist besonders vorteilhaft, daß eine Aufarbeitung der T-Zellen nicht erforderlich ist. So
- 25
- 30
- 35

müssen die T-Zellen nicht angereichert werden, weiterhin ist ein Entfernen oder Zerstören von anderen Zellen nicht notwendig. Hierdurch lässt sich das erfindungsgemäße Verfahren einfacher routinemäßig handhaben. Das Verfahren ist nicht so störanfällig durch Kulturbedingungen, Kontaminationen, kulturbedingte

5 Selektionen und Selektionierung von spezifischen Klonen wie das konventionelle Verfahren. Ein repräsentatives Bild von T-Zellen allgemein und T-Zellen, die durch Proteinfragmente stimuliert werden, lässt sich mit diesem Verfahren ermitteln.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen. Stammt die T-Zellen enthaltende Suspension aus einem Patienten, so lässt sich mit der Identifizierung zum Beispiel feststellen, gegen welches Proteinfragment/Epitop eines Virus-Antigens sich eine T-Zell-Antwort induzieren lässt. Ein solches

10 Proteinfragment/Epitop kann dann zur Stimulation weiterer T-Zellen des Patienten gezielt eingesetzt werden. Die so induzierten und zur Proliferation angeregten Zellen können so expandiert und anschließend dem Patienten retransfusiert werden.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich auch in der Tiermedizin verwenden. Dabei sind unterschiedlichste Tierarten und auch Konstellationen von Tierpatienten und

20 Spendern als Quelle der T-Zellen enthaltenden Suspension denkbar.

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind, aus Mikroorganismen, aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder

25 Geweben von Spendern oder Patienten stammen. Mikroorganismen sind zum Beispiel Viren, Bakterien, Pilze, Einzeller, Parasiten. Unter Makroorganismen fallen zum Beispiel alle mehrzelligen Eukaryoten. Gerade diese Quelle ist für die Beeinflussung von Allergien wichtig. Hierunter fallen Tiere und Pflanzen. Es können Zellen, Zellkulturen oder auch ganze Gewebe bestehend aus einer oder mehreren Schichten

30 oder Zell-Typen verwendet werden.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) oder Interleukin 2 sind. Jedoch sind auch andere

Zytokine möglich. Hier ist allein von Bedeutung, daß diese Zytokine fluoreszenzmarkiert werden können.

Auch können Aktivierungsmarker identifiziert werden, die aufgrund der T-Zell-Stimulation durch die Proteinfragmente exprimiert oder in der Expression gesteigert 5 werden. Der Marker CD69 ist hierfür beispielhaft. Beim Identifizieren von Aktivierungsmarkern die sich auf der Zelloberfläche befinden oder nicht sekretiert werden ist gegebenenfalls die Inhibition der Sekretion nicht mehr erforderlich.

Zytokine und Oberflächenmarker sind ausführlich beschrieben in Abul K. ABBAS et al. (1997) *Cellular and Molecular Immunology*, Philadelphia, 3. Auflage, ISBN 0-7216-10 4024-9.

Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen. Bedeutsam ist, daß die erfolgte Stimulation 15 eindeutig T-Zellen zuzuordnen ist.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, wobei die Stimulation mittels eines Durchflußzytometers erfaßt wird. Wesentlich ist dabei das Prinzip, daß Marker, die sich in der Zelle oder auf 20 deren Oberfläche befinden, wie beispielsweise Zytokine oder Oberflächenmarker mit einem spezifischen Detektor, zum Beispiel einem Antikörper in Kontakt treten, wobei der Detektor mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen ist. Nach Anregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes auf den in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen durch Laserlicht zeichnet das Durchflußzytometer die emittierten Streulicht und 25 Fluoreszenzsignale auf, was die zeitgleiche oder spätere Analyse der Zellen ermöglicht. Ausführlich sind solche Techniken beschrieben in Howard M. SHAPIRO (1995) *Practical Flow Cytometry*, New York, 3. Auflage, ISBN 0-471-30376-3. Die Detektion der intrazellulären Zytokine ist beschrieben in L. J. PICKER et al. (1995) *Blood*, Vol. 86, pp 1408.

30

#### Herstellung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragments/Peptides, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz oder 35 ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßigen Verfahren zum

Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gefunden worden ist, wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.

Festphasen-Synthese: Die Festphasen-Synthese ist ausführlich beschrieben in Solid 5. Phase Synthesis, E. ATHERTON and R.C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 und Amino Acid and Peptide Syntheses, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3.

Flüssigphasen-Synthese: Die Flüssigphasen-Synthese oder Lösungstechnik ist in Methoden der Organischen Chemie (Houben/WEYL), Bd. 15 / Nr. 1 und 2, E. 10 WÜNSCH (Herausgeber), Thieme Verlag Stuttgart, 1974 dargestellt.

Vorteilhaft ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz oder ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zum 15. Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gefunden worden ist, wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird, dabei weist das Proteinfragment/Peptid Insertionen, Deletionen oder Substituierungen auf (Modifikationen), wobei eine, zwei, drei oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, 20. deletiert oder inseriert sind, wobei das modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

25. Besonders vorteilhaft ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides der vorherigen Art, wobei das Proteinfragment / Peptid am N-terminalen und / oder C-terminalen Ende mindestens eine weitere natürliche oder nichtnatürliche Aminosäure und / oder eine Schutzgruppe besitzt (erweiterte Modifizierung), wobei das erweitert modifizierte 30. Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

Abkürzungen: Die im Text verwendeten Abkürzungen sind durch die Regeln bestimmt, die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur festgelegt worden 35. sind (Biochemistry 11: 1726 (1972) und Biochem. J. 219: 345 (1984)). Folgende

übliche Abkürzungen werden verwendet: Ala = A = Alanin; Arg = R = Arginin; Asn = N = Asparagin; Cys = C = Cystein; Gln = Q = Glutamin; Glu = E = Glutaminsäure; Gly = G = Glycin; His = H = Histidin; Ile = I = Isoleucin; Leu = L = Leucin; Lys = K = Lysin; Met = M = Methionin; Phe = F = Phenylalanin; Pro = P = Prolin; Ser = S = Serin; Thr = T = 5 Threonin; Trp = W = Tryptophan; Tyr = Y = Tyrosin und Val = V = Valin.

Vorteilhaft ist, wenn die Proteinfragmente, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden präsentiert werden, je nach Ende, Amino-Schutzgruppen oder Carboxyl-Schutzgruppen oder deren Varianten aufweisen.

10 Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den N-Terminus kann bestehen aus: Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acetylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.  
Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den C-Terminus können bestehen aus:

15 Einer Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

#### Verwendung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten als Medikament

20 Besonders bevorzugt ist die Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid, dessen Aminosäuresequenz bzw. ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifikation T-Zellen-stimulierender Proteinfragmente gefunden wurde und welches nach dem erfindungsgemäßen 25 Herstellungsverfahren produziert worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung eines Proteinfragmentes/Peptides, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.

30 Die Vakzinierung besteht darin, daß als Antigen Proteine von Viren, Bakterien eukaryotischen Einzellern oder Vielzellern nach der Ermittlung ihrer Sequenz in Proteinfragmente aufgeteilt werden, die gemäß der Erfindung zu T-Zell-enthaltenden Suspensionen gegeben werden. Die positiven Ansätze, in denen sich ein T-Zell-stimulierendes Proteinfragment befindet, werden als Ausgangspunkt für die 35 Herstellung einer Vakzine verwendet.

Die Desensibilisierung besteht darin, daß Proteinfragmente/Peptide ermittelt werden, die die unerwünschte, immunologische Reaktion auslösen. Anschließend werden die T-Zell-stimulierenden Proteinfragmente/Peptide bzw. die daraus entsprechend dem Herstellungsverfahren hergestellten Medikamente dem Patienten verabreicht. Der 5 jeweils gewünschte Effekt (Stimulation oder Desensibilisierung) wird über die Art und den Ort der Anwendung sowie die Dosis (z.B. Hochdosis-oder Niedrigdosistoleranzinduktion) und die begleitende Verabreichung beispielweise stimulierender oder tolerisierender Zytokine oder ähnlicher immunmodulatorisch aktiver Medikamente erreicht bzw. verstärkt. Proteinfragmente, die nicht nach diesem 10 erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden worden sind, wurden bereits erfolgreich als Medikamente eingesetzt, so z.B. bei der Vakzinierung von Rindern gegen Maul- und Klauenseuche (Collen et al.; J Immunol 1991; 146:749-755). Das in unserem Beispiel identifizierte Peptid wurde parallel durch konventionelle Technik von einer anderen Gruppe gefunden und befindet sich als Vakzine in Erprobung (Diamond et al. 15 Blood 1997; 5:1751-1767).

**Beispiele****Beispiel 1**

(Siehe Abbildung 1/2).

5

Mononukleäre Zellen wurden aus dem durch venöse Punktion gewonnenen peripheren Blut einer HLA-typisierten Patientin präpariert, welche das MHC-Klasse-I Allel HLA-A\*0201 besaß. Die Patientin besaß außerdem Antikörper gegen das humane Cytomegalie-Virus. Die nach Standardmethode präparierten Zellen wurden 10 für sechs Stunden unter optimierten Bedingungen mit den unten angegebenen Peptiden inkubiert. Diese stellen Bruchstücke eines aus der Literatur bekannten Proteinfragmentes des pp 65-Proteins des humanen Cytomegalie-Virus (Swiss-Prot PO6725) von 15 Aminosäuren Länge dar (Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gin Gly Gln Asn, pp65<sub>493-507</sub>). Dieses Proteinfragment ist bekannt dafür, daß es in 15 der Bulk-Kultur HLA-A2 restringierte, zytotoxische T-Zellen induzieren kann, also ein mit HLA-A2 präsentiertes T-Zell-Epitop enthält (M. R. WILLS et al. (1996) J. Virol. Vol. 70, pp 7569-7579). Die Länge von 9 Aminosäuren für die zu testende Bruchstücke wurde gewählt, da dieses die typische Länge von Epitopen ist, welche mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (H. G. RAMMENSEE et al. (1995) 20 Immunogenetics, Vol 41, pp 178-228). Die verwendeten Peptide überlappen sich um jeweils 8 Aminosäuren und stellen somit alle möglichen Bruchstücke dieser Länge dar. Die Peptide wurden als Mischung aus allen Peptiden oder einzeln eingesetzt. Die Peptidkonzentration im gezeigten Beispiel betrug 1 µg/ml je Peptid.

Folgenden Peptide wurden eingesetzt:

25

- 1) Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala
- 2) Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
- 3) Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
- 4) Leu Val pro Met Val Ala Thr Val Gln
- 5) Val pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly
- 30 6) pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln
- 7) Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn

30

Die Inkubation mit der Mischung aus allen Peptiden (Abbildung: Diagramm oben links) sowie Peptid 3 allein (Abbildung: Diagramm in der Mitte, zweites von oben) führten zur 35 Produktion von IFN-γ in T-Zellen, welches durch Messung am Durchflußzytometer auf

Einzel-Zellebene (J. L. PICKER et al., (1995) Blood, Vol 86, pp 1408-1419) nachgewiesen wurde, Keines der anderen einzeln getesteten Peptide hatte diesen Effekt. Eine in der Literatur veröffentlichte Untersuchung identifizierte exakt das gleiche Epitop innerhalb des gleichen Proteinsegments durch konventionelle 5 Methoden und bestätigt unser Ergebnis eindeutig (D. J. DIAMOND et al. (1997) Blood, Vol 90, pp 1751-1767).

Legende zur Abbildung 1/2:

Detektion von intrazellulär vorliegendem Interferon- $\gamma$  in CD8 $^{+}$  T-Lymphozyten nach 10 Stimulation mit der Mischung aus den 7 angegebenen Peptiden (Oben, ganz links) beziehungsweise den einzelnen Peptiden, pp65<sub>493-501</sub> bis pp65<sub>499-507</sub>. Der Marker CD69 wurde als Aktivierungsmarker verwendet. Die Darstellung ist auf CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$  Ereignisse eingegrenzt, angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität.

15 Beispiel 2

(Siehe Abbildung 2/2)

Mononukleäre Zellen wurden aus dem durch venöse Punktion gewonnenen 20 peripheren Blut einer HLA-typisierten Patientin präpariert, welche das MHC-Klasse-II Allel HLA-DR11 besaß. Die Patientin besaß außerdem Antikörper gegen das humane Cytomegalie-Virus. Die nach Standardmethode präparierten Zellen wurden für sechs Stunden unter optimierten Bedingungen mit Mischungen aus 11 oder 12 jeweils 15-Aminosäuren-langen Peptiden mit jeweils 11 Überlappungen entsprechend der 25 Sequenz des pp65 Matrix Phosphoproteins (Swiss-Prot PO6725) inkubiert (insgesamt 138 Peptide). Die Peptidkonzentration betrug 1  $\mu$ g/ml je Peptid. Drei der insgesamt 24 Mischungen stimulierten eindeutig CD4 $^{+}$  T-Zellen. Aufgrund der Versuchsanordnung (Vorkommen bestimmter Peptide in bestimmten Mischungen) ließen sich damit eindeutig 2 Peptide identifizieren, welche für diese Stimulation verantwortlich waren. 30 Dieses Ergebnis wurde durch die Stimulation mit den jeweils einzelnen Peptiden unter ansonsten gleichen Bedingungen bestätigt. Die identifizierten Peptide waren die benachbarten Peptide pp65<sub>365-379</sub> und pp65<sub>369-383</sub>. Diese Sequenzen decken sich weitgehend mit folgenden in der Literatur beschriebenen HLA-DR11 präsentierten Peptidsequenzen, welche auf konventionelle Weise als T-Zellen-stimulierende 35 Sequenzen identifiziert wurden: pp65<sub>361-376</sub> und pp65<sub>369-384</sub> (Khattab et al. (1998)

Journal of Medical Virology, Vol. 52, pp68-76), d.h. die stimulierenden Peptide finden sich innerhalb des Abschnitts definiert durch die Aminosäuren 361 und 384. Eine weitere Einengung der Epitopsequenz auf die zu postulierende Länge von 11 Aminosäuren ist noch nicht erfolgt.

5.

**Legende zur Abbildung 2/2**

Detektion von intrazellulär vorliegendem Interferon- $\gamma$  in CD3 $^+$ /CD8 $^-$  (links) nach Stimulation mit den Peptidmischungen 8, 9, und 20, bzw. CD3 $^+$ /CD4 $^+$  T-Lymphozyten (rechts) nach Stimulation mit den einzelnen Peptiden pp65<sub>365-379</sub> und pp65<sub>369-383</sub>. Beim 10 Screening (rechts) wurden Peptidmischungen verwendet und CD3 und CD8 als T-Zellmarker. Da die INF- $\gamma$  $^+$  Populationen links CD3 $^+$ /CD8 $^-$  sind wurde beim Nachtesten der Marker CD4 verwendet. Die Stimulierten T-Zellen sind eindeutig CD4 $^+$ . Dargestellt sind ausschließlich CD3 $^+$  Zellen, angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität.

15

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:
  - 5 a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, welches ein Protein oder Peptid ist,
  - b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,
  - c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,  
dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,
  - 10 d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,
  - e) Identifizieren
    - (i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin, das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,  
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden vor,  
und / oder
    - (ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,  
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein  
dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und
  - 15 f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den

Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

2. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach 5 Anspruch 1, wobei das Identifizieren von mindestens einem T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt.
3. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach 10 einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspensionen Zellen enthalten,  
die das Proteinfragment im wesentlichen an MHC-Klasse-I oder Klasse-II-Moleküle gebunden präsentieren.
4. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach 15 einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Proteinfragment bei der Klasse I restriktiven Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restriktiven Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt.
- 20 5. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension eine Suspension ist aus  
Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen.
- 25 6. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen.
- 30 7. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen.

8. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder Interleukin 2 sind.
- 5 9. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen.
- 10 10. Verfahren zum Herstellen von einem Proteinfragment/Peptid, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz bzw. ausgangliche Aminosäuresequenz nach dem Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gemäß einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 9 gefunden worden ist,
- 15 wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.
11. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspruch 10, 20 dabei weist das Proteinfragment/Peptid Insertionen, Deletionen oder Substituierungen auf (Modifikationen), wobei eine, zwei, drei oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder inseriert sind, wobei das modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht 25 modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.
12. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspruch 10 oder 11, 30 dabei das Proteinfragment / Peptid am N-terminalen und / oder C-terminalen Ende mindestens eine weitere natürliche oder nichtnatürliche Aminosäure und / oder eine Schutzgruppe besitzt (erweiterte Modifizierung), wobei das erweitert modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

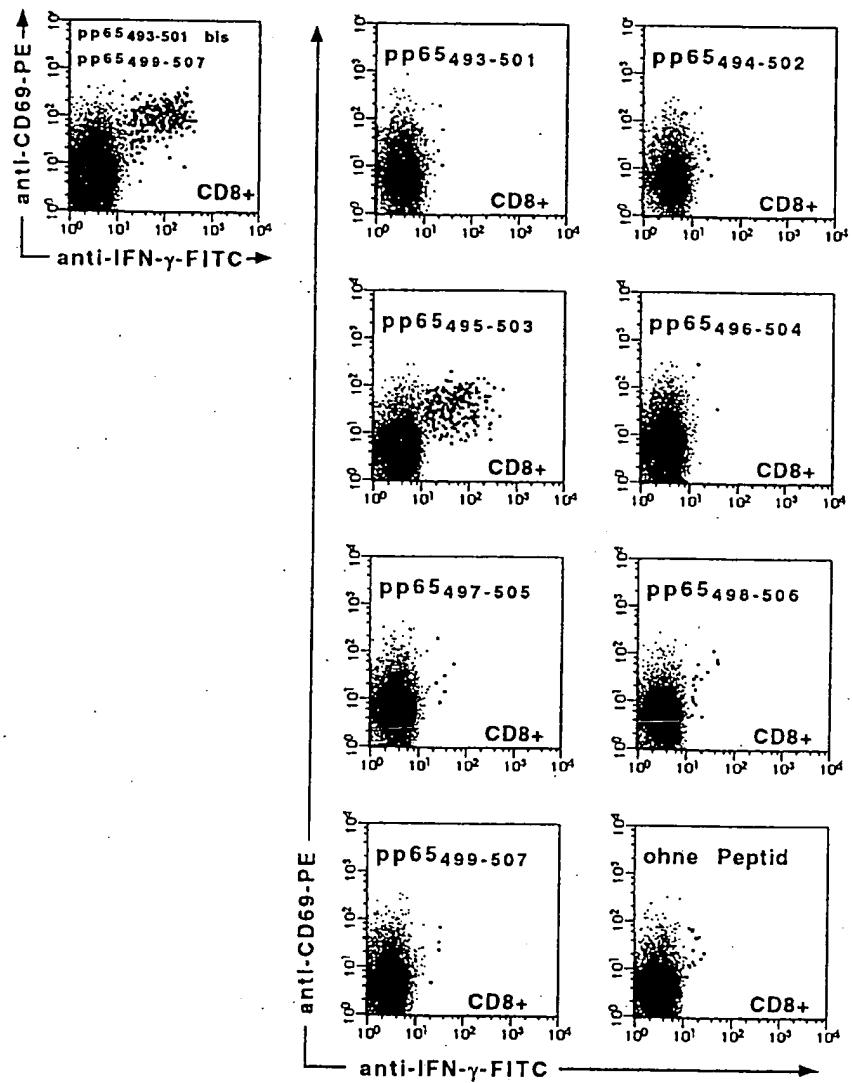
13. Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid, das nach dem Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche 10 bis 12 hergestellt worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.

5

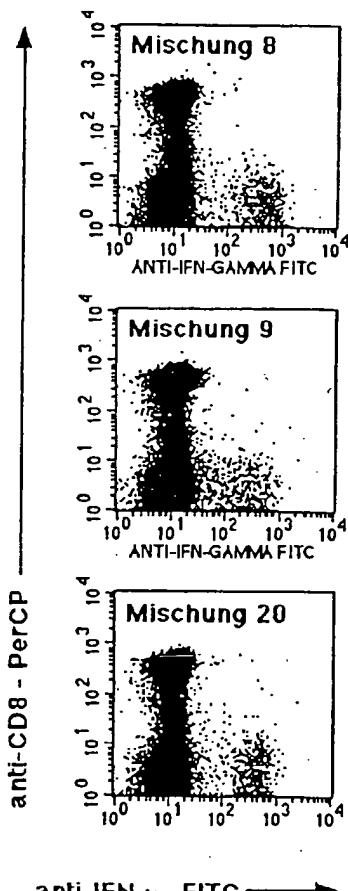
14. Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid nach Anspruch 13, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.

10

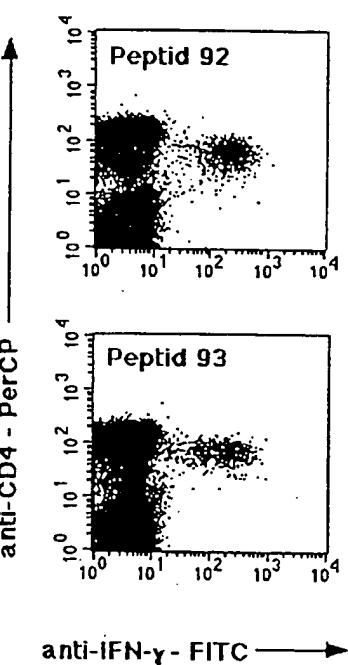
1/2



## Screening mit Mischungen



## Nachtesten von Einzelpeptiden



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : G01N 33/50, 33/68, C12P 21/00, A61K 38/17		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36568 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00175 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Januar 1999 (15.01.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 02 174.7 19. Januar 1998 (19.01.98) DE 198 34 932.7 28. Juli 1998 (28.07.98) DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9, D-10435 Berlin (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLK, Hans-Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). WALDEN, Peter [DE/DE]; Rykestrasse 4, D-10405 Berlin (DE). SCHEFFOLD, Alexander [DE/DE]; Alexandrinien- strasse 4, D-10969 Berlin (DE). BLASCHZYK, Rainer [DE/DE]; Ginsterweg 11, D-30989 Burgwedel (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 6. April 2000 (06.04.00)	
 <p>(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING T-CELL STIMULATING PROTEIN FRAGMENTS</p> <p>(54) Bezeichnung: VÉRFAHREN ZUM IDENTIFIZIEREN VON T-ZELL-STIMULIERENDEN PROTEINFRAGMENTEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for identifying T-cell stimulating protein fragments using the following steps: a) detecting the amino acid sequence of an antigen; b) subdividing the found amino acid sequence of the antigen into protein fragments; c) synthesizing at least one protein fragment; d) incubating a suspension containing t-cells with the protein fragments; e) identifying an induced T-cell cytokine or activation marker by flow-through cytometry, and; f) assigning the T-cells, with which T-cell cytokines and/or activation markers were identified, to the protein fragments which were incubated with the T-cells. The corresponding protein fragments/peptides are synthetically produced with the assistance of the detected positive sequence, and said corresponding protein fragments/peptides can be utilized to produce a medicament for immunostimulation.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten mit den folgenden Schritten: a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente, c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment, d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit den Proteinfragmenten, e) Identifizieren von einem induzierten T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker, durch Durchflusszytometrie, und f) Zuordnen der T-Zellen, bei denen T-Zell-Zytokine und/oder Aktivierungsmarker identifiziert wurden, zu den Proteinfragmenten, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden. Mit Hilfe der ermittelten positiven Sequenz werden die entsprechenden Proteinfragmente/Peptide synthetisch hergestellt und lassen sich zur Herstellung eines Medikamentes zur Immunstimulation verwenden.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Canada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/00175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 G01N33/50 G01N33/68 C12P21/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U: "CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 159, no. 2, 15 July 1997 (1997-07-15), pages 1012-1018, XP002125046 abstract page 1013	1-9

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

8 December 1999

23/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern...inal Application No

PCT/DE 99/00175

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEPANIAK, JOLIE A. ET AL: "A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats" J. IMMUNOL. (1995), 155(5), 2762-9 , XP002125047 abstract page 2763	1-9
A	SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J: "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens" IMMUNOLOGY, vol. 81, no. 2, February 1994 (1994-02), pages 171-176, XP000863031 abstract page 172	1-9
A	AUSUBEL LJ, KRIEGER JI, HAFLER DA: "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 159, no. 4, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 2502-2512, XP002125048 abstract page 2503	1-9
A	CELLO J, STRANNEGARD O, SVENNERHOLM B: "A study of the cellular immune response to enteroviruses in humans: identification of cross-reactive T cell epitopes on the structural proteins of enteroviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, no. 9, January 1996 (1996-01), pages 2097-2108, XP002125049 page 2097 -page 2099	1-9
A	PICKER LJ ET AL: "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 86, no. 4, page 1408-1419-1419 XP002108552 ISSN: 0006-4971 cited in the application abstract	1,8

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/00175

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KERN F; SUREL I P; FAULHABER N; FROMMEL C; SCHNEIDER-MERGNER J; SCHONEMANN C; REINKE P; VOLK H D: "Target structures of the CD8(+) -T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 8179-8184, XP002125050 figure 2	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00175

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N33/50 G01N33/68 C12P21/00 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALB WEBENTLICH ANGEBEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U: "CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 2, 15. Juli 1997 (1997-07-15), Seiten 1012-1018, XP002125046 Zusammenfassung Seite 1013 —	1-9

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderer bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"a" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Recherchenberichts

8. Dezember 1999

23/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00175

## C.(Fortsetzung) ALS WEBENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	STEPANIAK, JOLIE A. ET AL: "A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats" J. IMMUNOL. (1995), 155(5), 2762-9 , XP002125047 Zusammenfassung Seite 2763	1-9
A	SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J: "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens" IMMUNOLOGY, Bd. 81, Nr. 2, Februar 1994 (1994-02), Seiten 171-176, XP000863031 Zusammenfassung Seite 172	1-9
A	AUSUBEL LJ, KRIEGER JI, HAFLER DA: "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 4, 1. September 1997 (1997-09-01), Seiten 2502-2512, XP002125048 Zusammenfassung Seite 2503	1-9
A	CELLO J, STRANNEGARD O, SVENNERHOLM B: "A study of the cellular immune response to enteroviruses in humans: identification of cross-reactive T cell epitopes on the structural proteins of enteroviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 77, Nr. 9, Januar 1996 (1996-01), Seiten 2097-2108, XP002125049 Seite 2097 -Seite 2099	1-9
A	PICKER LJ ET AL: "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry" BLOOD, US, PHILADELPHIA, PA, Bd. 86, Nr. 4, Seite 1408-1419-1419 XP002108552 ISSN: 0006-4971 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,8

-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/00175

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>KERN F; SUREL I P; FAULHABER N; FROMMEL C;      SCHNEIDER-MERGENER J; SCHONEMANN C; REINKE      P; VOLK H D: "Target structures of the      CD8(+)T-cell response to human      cytomegalovirus: the 72-kilodalton major      immediate-early protein revisited"      JOURNAL OF VIROLOGY,      Bd. 73, Nr. 10, Oktober 1999 (1999-10),      Seiten 8179-8184, XP002125050      Abbildung 2</p>	1-9